

Artículo Original / Original Article

Nivel de daño genético en estudiantes de medicina fumadores de cigarrillo convencional y cigarrillo electrónico

Level of genetic damage in medical students conventional cigarettes smokers and electronic cigarettes smokers

Jaime Alfredo Segovia Abreu¹, **Maria José Samaniego Royg**¹, **Boris Alexei Thielmann Arbo**¹, **José Franciso Ortiz Gómez**¹, **José Mael Pino**¹, **Ahmad Hamad Rahal**¹, **Deidamia Mercedes Franco**¹, ***Diana Patrizia Castiglioni Serafini**¹

¹Universidad Católica “Nuestra Señora de la Asunción”, Facultad de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Genética Toxicológica. Asunción, Paraguay

RESUMEN

La creciente prevalencia del consumo de productos de tabaco, incluyendo cigarrillos convencionales y electrónicos, ha suscitado preocupaciones sobre sus efectos nocivos en la salud humana, especialmente entre los jóvenes. Este estudio se centró en comparar el daño del material genético entre estudiantes de medicina que usan cigarrillos convencionales y electrónicos. El objetivo fue evaluar el nivel de daño del ADN entre estudiantes, divididos equitativamente entre fumadores de cigarrillos convencionales y electrónicos, utilizando un enfoque observacional analítico. La metodología empleó el Ensayo del Cometa para medir el daño genético, con análisis realizados por el software Comet Imager v2.2, evaluando parámetros como el OTM y el porcentaje de ADN en la cola, con significancia estadística determinada mediante la prueba t-student ($p < 0.05$). Los resultados mostraron una diferencia significativa en el daño genético: los fumadores de cigarrillos convencionales presentaron un OTM de 12.73 ± 7.50 y un porcentaje de ADN en la cola de 34.34 ± 14.33 , en comparación con OTM de 6.58 ± 4.61 y un porcentaje de ADN de 26.88 ± 10.93 en los fumadores de cigarrillos electrónicos. Esta diferencia podría atribuirse al mayor tiempo de exposición a cigarrillos convencionales en comparación al tiempo de exposición en el caso de fumadores electrónicos. En conclusión, se han observado daños significativos en el ADN en fumadores tanto de cigarrillos convencionales como de electrónicos con respecto al grupo control. Sin embargo, se sugiere la necesidad de estudios adicionales sobre los efectos a largo plazo de los cigarrillos electrónicos.

Palabras claves: Cigarrillo electrónico, ensayo cometa, genotoxicidad, fumadores.

ABSTRACT

The increasing prevalence of tobacco product consumption, including conventional and electronic cigarettes, has raised concerns about their harmful effects on human health, particularly among young individuals. This study was focused on comparing genetic material damage among medical students using conventional and electronic cigarettes. The objective was to assess DNA damage levels in students, equally divided between conventional and electronic cigarette users, employing an analytical observational approach. The methodology utilized the Comet Assay to measure genetic damage, with analyses performed using Comet Imager v2.2 software. Parameters such as Olive Tail Moment (OTM) and the percentage of DNA in the tail were evaluated, with statistical significance determined by the Student's t-test ($p < 0.05$). Results revealed a significant difference in genetic damage: conventional cigarette users exhibited an OTM of 12.73 ± 7.50 and a tail DNA percentage of 34.34 ± 14.33 , compared to an OTM of 6.58 ± 4.61 and a tail DNA percentage of 26.88 ± 10.93 in electronic cigarette users. This difference may be attributed to the longer exposure duration to conventional cigarettes compared to electronic cigarettes. In conclusion, significant DNA damage was observed in both conventional and electronic cigarette users relative to the control group. However, further studies are suggested to explore the long-term effects of electronic cigarettes.

Keywords: electronic cigarette, comet assay, genotoxicity, smokers.

*Autor correspondiente: Castiglioni D. Email: dicastiglioni@gmail.com

Fecha de recepción: Julio 2024 Fecha de aceptación: Agosto 2024



Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una licencia Creative Commons

INTRODUCCIÓN

Las células del cuerpo humano están constantemente expuestas a factores que podrían causar potenciales daños al ADN. El consumo de tabaco es uno de los factores de riesgo para la salud humana, constituyendo uno de los problemas de salud pública a nivel mundial^(1,2). Investigaciones previas demuestran que el humo de cigarrillo contiene más de 7.000 sustancias tóxicas que son responsables de los daños sobre el aparato circulatorio y respiratorio, de las cuales 69 son carcinógenos demostrados para humanos; encontrados en los productos de la combustión, como: el benceno, acetaldehído, formaldehído, clasificados así por la "International Agency for Research on Cancer" (IARC)^(3,4). Debido a esta problemática, el cigarrillo electrónico (CE) es promocionado como una opción menos dañina que el tabaco y como una alternativa para dejar de fumar el cigarrillo convencional o de combustión⁽⁵⁾. El mismo consiste en un dispositivo que consta de una fuente de poder, cámara de vaporización con una bobina de calentamiento y un cartucho que almacena el componente líquido que contiene nicotina y saborizantes disueltos. Al calentarse el dispositivo, sin combustión, su contenido es aerolizado, se emite un vapor y este es inhalado por el usuario,⁽⁶⁻⁸⁾. De este modo, el líquido se convierte en una mezcla de aerosoles que entran en los pulmones del fumador para inundarlos con distintas fragancias.

Su expansión en los últimos años se debe a las campañas de marketing para los cigarrillos electrónicos, que son transmitidas en los distintos medios de comunicación masivos. Estos además son distribuidos libremente en centros comerciales y son de fácil acceso para los adolescentes⁽⁹⁾. El Paraguay no cuenta con una legislación vigente que regule la comercialización de los cigarrillos electrónicos, por lo que menores de edad (<18 años) tienen alcance a estos productos.

Investigaciones recientes sobre los efectos del cigarrillo electrónico exponen que estos dispositivos generan sustancias potencialmente nocivas para la salud como el formaldehído, acetaldehído, acroleínas (un producto usado en plaguicidas) y metales pesados (níquel, cobre, zinc y plomo)^(3,10). Entre uno de sus componentes más dañinos podemos encontrar nanopartículas de cobre, que tiene una alta capacidad de generar estrés oxidativo y genotoxicidad, lo que puede llevar a una fragmentación del ADN⁽¹¹⁾. Otros estudios muestran también los efectos agudos a nivel pulmonar, cardiovascular, inmunológico y neurológico^(10,12,13). La investigación realizada por Lerner *et al.* en 2016, demostró que el vapor de los CE aumenta la secreción de interleucinas (IL) como IL-6 e IL-8 (ambos mediadores de inflamación) por fibroblastos HFL-1 debido al aumento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden provocar daño en el material genético⁽¹⁴⁾. Siendo estos estudios de alta importancia, queda la interrogante de como el cigarrillo electrónico podría afectar al material genético del usuario, y qué diferencias de daño existiría en relación al cigarrillo convencional. Los estudios sobre el impacto del cigarrillo electrónico en la salud continúan en expansión, impulsados por los recientes hallazgos acerca de los efectos de los mismos. Siendo importante seguir investigando acerca de este tema, para evidenciar las posibles consecuencias que conllevan el uso del mismo. Los datos obtenidos en esta investigación pueden contribuir a nuevos conocimientos en el área de genética toxicológica.

El objetivo de este trabajo es evaluar el nivel de daño sobre el material genético en estudiantes de medicina fumadores de cigarrillo electrónico y cigarrillo convencional con un rango de edad de 18 a 22 años.

METODOLOGÍA

El presente trabajo tuvo lugar en el predio de la Universidad Católica de Nuestra Señora Asunción, realizándose los análisis en el laboratorio de genética toxicológica. El trabajo corresponde a un estudio del tipo observacional analítico comparando dos grupos expuestos y un grupo control.

En este estudio fueron incluidos 57 estudiantes fumadores y 18 estudiantes no fumadores (perteneciente al grupo control) de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción, de ambos sexos de rango etario entre 18 y 25 años. Para este estudio se han tenido en cuenta los siguientes criterios de inclusión: Jóvenes estudiantes no fumadores, fumadores de cigarrillo electrónico o cigarrillo convencional, que consuman alcohol moderadamente (<1000 ml de cerveza o 400 ml de vino por día), cursando la carrera de medicina, que hayan aceptado por voluntad propia participar del estudio, firmado el consentimiento informado y se encuentren dentro del rango de edad establecido. Se ha considerado como fumadores de cigarrillo convencional a aquellos que fumaban de 20 a 40 cigarrillos por día⁽¹⁵⁾. Para este estudio han quedado excluidos alumnos que presentaban alguna enfermedad genética, fumadores de ambos tipos de cigarrillo, normal y electrónico, usuarios de cigarrillo electrónico que hayan fumado un cigarrillo convencional en los últimos 78 días⁽¹⁶⁾, consumidores de drogas ilícitas, pacientes oncológicos o aquellos sometidos a terapias inmunosupresoras, estudiantes expuestos a rayos X en los últimos 6 meses y aquellos que no hayan querido firmar el consentimiento informado.

Las personas que aceptaron participar del estudio fueron divididas en 3 grupos, 29 fumadores de cigarrillo electrónico, 28 fumadores de cigarrillo normal y 18 sujetos no fumadores utilizados como grupo control, respondiendo voluntariamente al cuestionario elaborado para delimitar las características sociodemográficas de la población. Los nombres de los participantes fueron previamente codificados para asegurar el anonimato de los mismos.

Evaluación de daño al ADN por el Ensayo Cometa

Se llevó a cabo el protocolo de Singh *et al.*, en 1998⁽¹⁷⁾, para el Ensayo del Cometa en medio alcalino y teniendo en cuenta las optimizaciones metodológicas mencionadas por Hartmann en 2003⁽¹⁸⁾. Se obtuvieron 40 µl de sangre periférica del dedo anular de cada participante, recogidas en tubos eppendorf, que contenían una solución de RPMI, 20 mM EDTA y 10% de DMSO, conservadas a -10 °C. Se tomaron 80 µl de la muestra inicial y se depositaron en otro tubo que contenía 240 µl de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0,7%. A continuación, las muestras fueron sembradas en láminas gelificadas con agarosa de punto de fusión normal (NMP) al 1%, para luego ser recubiertas con una tercera capa más de 100 µl de agarosa LMP.

Las láminas gelificadas se mantuvieron a 40°C durante 6 a 8 horas sumergidas en una solución de lisis compuesta por un tampón de lisis, Triton x-100 y dimetilsulfóxido (DMSO), con el fin de provocar la lisis de las membranas. Se colocaron las láminas en una cubeta de electroforesis con buffer alcalino a pH 12,5 durante 20 minutos para permitir la descompactación del ADN y la exposición de los sitios álcali-débiles dañados. A continuación, se realizó la electroforesis por 20 minutos a 25V y 300mA. Finalizada la electroforesis, las láminas fueron lavadas en un tampón de neutralización 0.4M Trizma base a pH 7,5 para eliminar el exceso de álcali. Para la tinción se utilizaron 80 µl de bromuro

de etidio (10µg/ml) por cada lámina, veinte minutos después fueron lavadas en agua desionizada para eliminar el exceso de colorante. Finalmente, fueron examinadas bajo el microscopio de Epifluorescencia (ZEISS AXIOS A1) con un aumento de 200X, utilizando un filtro de 590 nm.

Definición operacional de variables: Se evaluaron 200 células por participante y se analizaron mediante el software Comet Imager de MetaSystems Germany ®. Para determinar el daño celular, se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

- **Tail Length (TL):** longitud total del cometa, desde el centro nuclear hasta el final de la cola del mismo.
- **Tail Moment (TM):** longitud de migración del ADN fuera del núcleo conformando la cola del cometa.
- **Olive Tail Moment (OTM):** tamaño de la cola del cometa más la fracción de ADN total desde el centro de la cabeza hasta el final de la cola.
- **Tail DNA:** porcentaje de ADN en la cola del cometa que indica la cantidad de ADN fragmentado que migró en la electroforesis.

Análisis estadísticos: Los datos fueron analizados mediante la prueba T-Student para un nivel de significancia $p < 0.05$ con el software de IBM-SPSS v23. Se estableció como unidad de análisis la población celular analizada.

Aspectos éticos: El estudio solo fue aplicado a las personas que aceptaron participar del mismo y firmaron el consentimiento informado. El protocolo de la investigación fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Católica "Nuestra Señora de la Asunción" y se elaboró siguiendo los principios bioéticos de la Declaración de Helsinki y cumpliendo los estándares éticos del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS).

RESULTADOS

Características demográficas de la población

La población estudiada constó de 75 estudiantes de la Facultad de Ciencias de la Salud, siendo estos divididos en tres grupos: 29 fumadores de cigarrillo electrónico, 28 fumadores de cigarrillo convencional y 18 no fumadores utilizados como grupo control, considerándose respectivamente a aquellos participantes entre los dos primeros grupos que para el momento del estudio hayan sido usuarios únicamente del cigarrillo electrónico o cigarrillo convencional. Como medida de consumo en el caso de los fumadores de cigarrillo convencional, se estableció una mínima de 20 cigarrillos y una máxima de 40 cigarrillos por día (15). En el caso de los fumadores de cigarrillo electrónico la media de consumo en ml de líquido fue de 9.2 ± 7.33 por día. El rango etario de la población estudiada fue de 18 a 25 años, con un promedio de 19.5 ± 2.15 años para el grupo de fumadores de cigarrillo electrónico, 22.1 ± 2.22 años para el grupo de los fumadores de cigarrillo convencional y 20.1 ± 1.21 para el grupo control.

Evaluación del nivel de daño del ADN

A través del Ensayo del Cometa realizado en 200 células de cada muestra de la población estudiada, siendo estas las unidades de análisis, se obtuvieron cuantificaciones de la polifragmentación del material genético medidos a través de los parámetros del Largo de la Cola (Tail Length o TL), Momento de la Cola (Tail Moment o TM), Momento Olive de la Cola (Olive Tail Moment u OTM) y Porcentaje de ADN en la cola (%DNA), cuyos promedios se muestran en la Tabla 1. Todos los parámetros se obtuvieron por medio de Software Comet Imager v2.2 cuya referencia se hace en la Figura 1 donde se puede observar la fragmentación del ADN, a través del software.

Tabla 1. Datos cuantitativos de los parámetros brindados por el software Comet Imager v2.2 para el Ensayo del Cometa.

Grupo	Tail Length (TL)	Tail Moment (TM)	Olive Tail Moment (OTM)	%DNA
Fumadores de Cigarrillo	36.61 ±	14.15 ±	6.58 ±	26.88 ±
Electrónico	18.69	11.09	4.61	10.93
Fumadores de Cigarrillo	51.15 ±	27.3 ±	12.73 ±	34.34 ±
Convencional	19.61	16.27	7.50	14.33
No Fumadores (Grupo Control)	12.22 ±	3.77 ±	1.79 ±	8.27 ±
	9.17	3.32	1.61	5.08

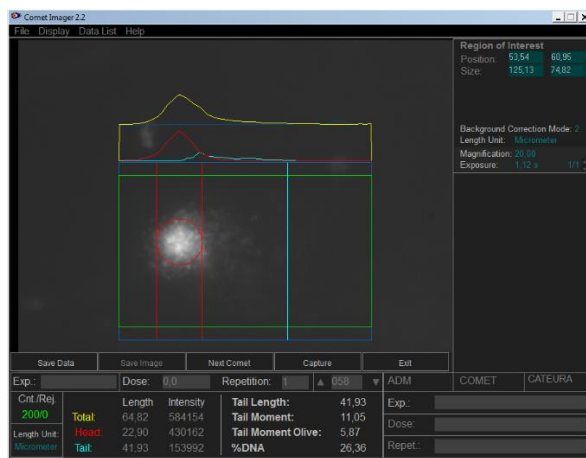


Figura 1. Cometa observada a través del software Comet Imager v2.2 ilustrando la fragmentación del material genético cuantificado con los parámetros Tail Length (TL), Tail Moment (TM), Olive Tail Moment (OTM) y %DNA, de un fumador.

Se demostró una diferencia altamente significativa entre los grupos expuestos y los controles utilizando la prueba de t-student calculada para una $p < 0.05$ en cada uno de los parámetros obtenidos en los tres grupos analizados. Esta diferencia puede evidenciarse en la Figura 2, donde se compara el promedio de los parámetros obtenidos.

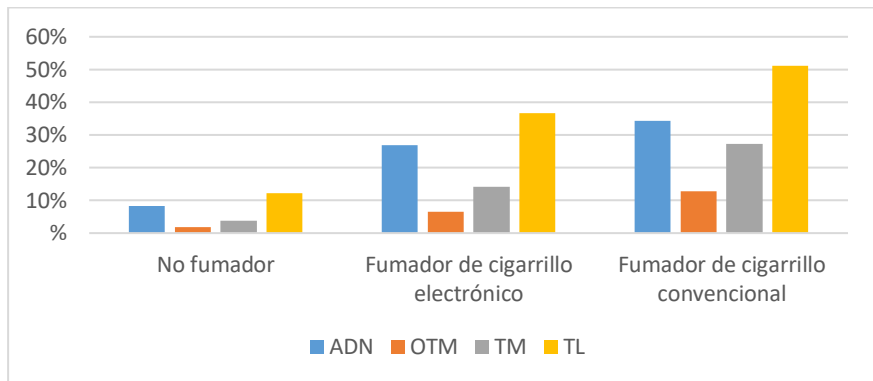


Figura 2. Variación de los parámetros Tail Length (TL), Tail Moment (TM), Olive Tail Moment (OTM) y Tail DNA (%DNA) medidos con el software Comet Imager en los tres grupos de estudio.

DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en el estudio han demostrado un nivel de daño mayor en los usuarios de cigarrillo convencional y un menor daño en los usuarios de cigarrillo electrónico. Sin embargo, al comparar el nivel de daño de los usuarios de cigarrillo electrónico con el grupo control, se encontró una diferencia significativa, para una t-student de $p < 0.05$, cuantificando los parámetros a través del Ensayo del Cometa.

La medición de los parámetros, indicadores de daño del material genético, obtenidos por el bioensayo utilizado y cuantificados por el software Comet Imager v2.2, ha demostrado un aumento en los valores de los mismos, (Figura 2) como el TL, TM, OTM y % DNA en la cola, en mayor medida en los usuarios de cigarrillo convencional y en menor medida en los usuarios de cigarrillo electrónico respecto al grupo control. Este aumento en el índice de daño indica un incremento en la fragmentación del material genético que migra durante la electroforesis formando la cola del cometa, atendiendo a la condición de que, a mayor daño, mayor es el valor para TL⁽¹⁹⁾. Pese a que D. Thorne *et al.* menciona que exponiendo a bacterias *Salmonella typhimurium* a 3 horas del vapor generado por el cigarrillo electrónico, no mostraron mutagenicidad a través del test de Ames⁽²⁰⁾, la ausencia de mutagenicidad no indica una ausencia de genotoxicidad⁽²¹⁾, puesto que se sabe que las nano partículas de cobre producidas por el cigarrillo electrónico puede desencadenar estrés oxidativo celular, y por consiguiente, fracturas en la molécula de ADN⁽²²⁾ de los individuos expuestos a estos agentes. Así como se observa en los valores expresados en la Tabla 1 de las células de linfocitos analizadas de los usuarios de cigarrillo electrónico.

Relacionando la variación de concentración de nicotina del líquido para el vapeo con el CE se ha encontrado un aumento dosis/respuesta en el nivel de daño al material genético como se puede observar en la Figura 3. Esta variación en los parámetros medidos podría asociarse a un aumento en el riesgo a desarrollar neoplasias. Además, el calor producido por el cigarrillo electrónico, libera sustancias orgánicas como formaldehído y acetaldehído y metales pesados como níquel, cromo y plomo, considerados agentes genotóxicos y carcinógenos directos. Agregado a esto, la acroleína presenta propiedades carcinogénicas

indirectas ya que genera un metabolito carcinogénico (glicidol), clasificados por la IARC^(10,23).

El mayor nivel de daño identificado en los usuarios de cigarrillo convencional (promedio de 5 años) podría deberse a un mayor tiempo de exposición en comparación a los individuos expuestos a los agentes químicos del cigarrillo electrónico (promedio 2 años).

Cabe resaltar, que, aunque el daño mostrado por el CE sea menor, este no indica la ausencia de efectos genotóxicos sobre el material genético de individuos expuestos, ya que el 6.9% de los usuarios de cigarrillo electrónico, que nunca han utilizado el cigarrillo convencional, presentan un daño en el material genético superior al daño del grupo control y cercano a la media de daño establecida para los usuarios de cigarrillo electrónico. Si bien el 93.1% de la población de usuarios de cigarrillo electrónico, fueron anteriormente usuarios del cigarrillo convencional, lo que eleva la cantidad de factores de riesgo cuando actúan en conjunto según Wills *et al.* en 2015⁽⁹⁾, dejaron de fumar cigarrillos convencionales por más de 6 meses para el momento del estudio. Estos factores no invalidan las conclusiones del trabajo ya que DeMarini *et al.* en 2004, han demostrado que luego de 78 días del cese del uso del cigarrillo convencional, el daño al material genético se ve reducido⁽¹⁶⁾.

Este estudio provee nuevos datos sobre el impacto del cigarrillo electrónico a nivel de la molécula de ADN. Estos resultados revelan la relación directa entre el tiempo de exposición y el aumento de la fragmentación del material genético, evidenciado por los cometas y los parámetros medidos, en comparación a un grupo no expuesto. La importancia de estos datos radica en el uso los mismos como base y justificación para futuras investigaciones sobre el CE y su impacto en la salud humana.

Se sugiere ampliar los estudios respecto al uso de los cigarrillos electrónicos en las diferentes áreas de investigación con todas sus variantes.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Genética Toxicológica de la Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción por los insumos provistos para la investigación a través de su programa de Iniciación Científica.

Contribución de Autores

Concepción/diseño de trabajo: Jaime Segovia, Diana Castiglioni, Deidamia Franco
Recolección de datos/información: Maria José Samaniego Royg, Boris Thielman, Maria José Samaniego Royg

Preparación y evaluación de muestras: José Ortiz, Boris Thielman, Manuel Pino, Ahmad Rahal

Análisis/discusión de los datos: Diana Castiglioni; Boris Thielman, Jaime Segovia, Deidamia Franco

Preparación del manuscrito: Diana Castiglioni, Deidamia Franco, José Ortiz,

Revisión de la versión final: Jaime Segovia, Diana Castiglioni

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no presentar conflictos de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Scherübl H. Tabakrauchen und Krebsrisiko. Pneumologie [Internet]. Enero de 2023 [consultado el 12 de septiembre de 2024]; 77(01): 27-32. <https://doi.org/10.1055/a-1916-1466>
- González Romero PM, Cuevas Fernández FJ, Marcelino Rodríguez I, Rodríguez Pérez M del C, Cabrera de León A, Aguirre-Jaime A. ETAP: una escala de tabaquismo para la atención primaria de salud. Atención Primaria [Internet]. 2016;48(5):288-94. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2015.04.010>
- Gómez Cerezo JF, López Paz JE, Fernández Pardo J. Actualización sobre las nuevas formas de consumo de tabaco. Clin Investig En Arterioscler [Internet]. Mayo de 2022 [consultado el 12 de septiembre de 2024]. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2022.03.004>
- Polzin GM, Kosa-Maines RE, Ashley DL, Watson CH. Analysis of volatile organic compounds in mainstream cigarette smoke. Environ Sci Technol. 2007;41(4):1297-302.
- Ratajczak A, Jankowski P, Strus P, Feleszko W. Heat Not Burn Tobacco Product—A New Global Trend: Impact of Heat-Not-Burn Tobacco Products on Public Health, a Systematic Review. Int J Environ Res Public Health [Internet]. 8 de enero de 2020 [consultado el 12 de septiembre de 2024]; 17(2): 409. <https://doi.org/10.3390/ijerph17020409>
- Martínez-Larenas MV, Montañez-Aguirre ÁA, González-Valdelamar CA, Fraga-Duarte M, Cossío-Rodea G, Vera-López JC. Efectos fisiopatológicos del cigarro electrónico: un problema de salud pública. NCT Neumol Cirugía Torax [Internet]. 2022 [consultado el 12 de septiembre de 2024]; 81(2): 121-30. <https://doi.org/10.35366/108498>
- Córdoba García R. El desafío de los cigarrillos electrónicos. Aten Primaria [Internet]. 2014; 46(6): 307-12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aprim.2014.01.002>
- Jimenez Ruiz CA, Solano Reina S, de Granda Orive JI, Signes-Costa Minaya J, de Higes Martínez E, Riesco Miranda JA. El cigarrillo electrónico. Declaración oficial de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) sobre la eficacia, seguridad y regulación de los cigarrillos electrónicos. Arch Bronconeumol [Internet]. 2014; 50(8): 362-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arbres.2014.02.006>
- Wills TA, Knight R, Williams RJ, Pagano I, Sargent JD. Risk Factors for Exclusive E-Cigarette Use and Dual E-Cigarette Use and Tobacco Use in Adolescents. Pediatrics [Internet]. 2015; 135(1): e43-51. <https://doi.org/10.1542/peds.2014-0760>
- Buljbasich D. Cigarrillo electrónico: ¿un moderno caballo de Troya? Arch Bronconeumol. 2015;51(7):313-4.
- Liao W, McNutt M a, Zhu W. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. Methods [Internet]. 2009; 48(1): 46-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmeth.2009.02.016>
- Farsalinos KE, Voudris V, Poulas K. E-cigarettes generate high levels of aldehydes only in "dry puff" conditions. Addiction. 2015;110(8): 1352-6.
- Overbeek, D. et al. (2020) 'A review of toxic effects of electronic cigarettes/vaping in adolescents and young adults. Critical Reviews in Toxicology', *Critical Reviews in Toxicology*, 50(6), pp. 531-538. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/10408444.2020.1794443>
- Lerner CA, Rutagarama P, Ahmad T, Sundar IK, Elder A, Rahman I. Electronic cigarette aerosols and copper nanoparticles induce mitochondrial stress and promote DNA fragmentation in lung fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2016;477(4):620-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.109>
- Nersesyan A, Muradyan R, Kundi M, Knasmueller S. Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: A comparative study with different cigarette types. Mutagenesis. 2011; 26(2): 295-301.
- DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: A review. Mutat Res - Rev Mutat Res. 2004; 567(2-3 SPEC. ISS.): 447-74.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 1988;175(1):184-91.
- Hartmann a., Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. Mutagenesis [Internet]. 2003;18(1):45-51. <https://doi.org/10.1093/mutage/18.1.45>
- Collins a R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Mol Biotechnol [Internet]. 2004;26(3):249-61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004294>
- Thorne D, Crooks I, Hollings M, Seymour A, Meredith C, Gaca M. The mutagenic assessment of an electronic-cigarette and reference cigarette smoke using the Ames assay in strains TA98 and TA100. Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen [Internet]. 2016; 812: 29-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.10.005>
- Gutiérrez JB, López de Cerain Salsamendi A. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. 1a Edición. Madrid (España): Diaz de Santos S.A; 2001. 368 p.
- Prá D, Franke SIR, Giulian R, Yoneama ML, Dias JF, Erdtmann B, et al. Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. BioMetals. 2008;21(3):289-97.
- Smith CJ, Perfetti TA, Garg R, Hansch C. IARC carcinogens reported in cigarette mainstream smoke and their calculated log P values. Food Chem Toxicol. 2003;41(6):807-17.